家蚕性附腺发育与核酸及利它素蛋白变化的关系

高其康[1,2]，楼兵干[3]，董海涛[4]，胡　萃[2]

（1. 浙江大学分析测试中心，杭州　310029；2. 浙江大学应用昆虫研究所，杭州　310029；3. 浙江大学植物保护系，杭州　310029；4. 浙江大学生物技术研究所，杭州　310029）

摘要：对不同发育时期家蚕 *Bombyx mori* 雌性性附腺核酸和蛋白质含量测定的结果表明，从家蚕化蛹后第 6 天到成虫羽化当天的性附腺内总蛋白质含量不断增加，至羽化当天为最高，达 860 ± 70 μg/对。不同时期内能引诱野蚕黑卵蜂识别寄主的利它素在总蛋白中所占的比例差异明显，从化蛹后第 6 天的 10% 增加到羽化后的 58%。性附腺的总 RNA 含量从化蛹第 6 天到成虫羽化前 1 天几乎是直线增加，但羽化后下降很快。不同时期分泌部中总 RNA 含量变化与贮存部明显不同。含量最高时，分泌部 RNA 可占整个性附腺 RNA 的 90% 以上，而贮存部总 RNA 含量则远少于分泌部，羽化当天约为分泌部的十分之一。分泌部总 RNA 中的 18S 亚基含量远高于 28S 亚基，明显不同于贮存部的。从分泌部总 RNA 中分离的 mRNA 存在明显的条带分布，这预示着高丰度的 mRNA 的存在与总蛋白中高含量利它素的存在有着特殊对应关系。

关键词：家蚕；野蚕黑卵蜂；利它素；核酸

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）05-0583-05

The relationships between development, nucleic acids and kairomone proteins of *Bombyx mori* female accessory glands

GAO Qi-Kang[1,2]，LOU Bing-Gan[3]，DONG Hai-Tao[4]，HU Cui[2]（1. Center of Analysis and Measurement，Zhejiang University，Hangzhou　310029，China；2. Institute of Applied Entomology，Zhejiang University，Hangzhou　310029，China；3. Department of Plant Protection，Zhejiang University，Hangzhou　310029，China；4. Institute of Biotechnology Research，Zhejiang University，Hangzhou　310029，China）

Abstract: Based on changes in nucleic acids and proteins during the development of *Bombyx mori* female accessory glands，it was determined that the protein content in these glands increased gradually from the sixth day after pupation to day of eclosion，peaking on the day of eclosion（860 ± 70 μg/pair）. The ratio of host *Telenomus theophilae* recognition kairomone to total protein varied significantly at different development stages，from 10% on the sixth day after pupation to 58% on the day of eclosion. The amount of total RNA increased from the sixth day after pupation to the day just before eclosion，but decreased quickly after eclosion. The quantity of RNA varied significantly between the secretory and reservoir portions. In the secretory portion，the amount of total RNA changed significantly during the development of the accessory glands. At its peak，the total RNA in the secretory portion accounted for more than 90% of the total RNA in the accessory glands. In contrast，the amount of total RNA in the reservoir portion was much less than that in the secretory portion and did not change significantly through development. The total RNA in the reservoir portion was only 1/10 as much as in the secretory portion on the day before eclosion. Agarose gel electrophoresis indicated that the quantity of 18S rRNA was much higher than that of 28S rRNA in the secretory portion. Certain sizes of extracted mRNA were relatively abundant，suggesting that these kinds of mRNA are specifically related to certain major secretory proteins.

Key words: *Bombyx mori*； *Telenomous theophilae*； host recognition kairomone； nucleic acids

雌性昆虫性附腺分泌物的作用主要是使卵粘附于产卵场所（Callahan and Casio，1963；Ferro and Akre，1975），从 20 世纪 80 年代初开始，国外有报道认为性附腺分泌物中的某些成分能引诱并刺激寄

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30070515），浙江省自然科学基金资助项目（398255，300304）

第一作者简介：高其康，男，1962 年 2 月生，博士，副研究员，从事昆虫生理生化与分子生物学研究，E-mail：qkgao@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2001-07-06；接受日期 Accepted：2002-11-18

生蜂进行产卵（Strand *et al*., 1982，1983a，1983b；Nordlund *et al*., 1987）。国内高其康和胡萃（1995）的研究发现能引诱野蚕黑卵蜂 *Telenomus theophilae* 识别寄主的利它素源于野蚕 *Theophila mandarina* 和家蚕 *Bombyx mori* 雌蛾性附腺的分泌物中，说明家蚕和野蚕性附腺分泌物中除了具有卵粘着作用外，还有可以引诱野蚕黑卵蜂搜寻并寄生寄主卵的寄主识别利它素。高其康和胡萃（2000a）采用高效液相色谱法对家蚕雌蛾性附腺的分泌物进行了分离鉴定，明确性附腺内容物经高效液相色谱分离后，保留时间最短的第一主组份具有利它素活性，能引诱野蚕黑卵蜂在涂有第一主组份的人工卵上搜索并诱发产卵行为。进一步的研究确定了该利它素是一种蛋白质。高其康和胡萃（2000b）从细胞结构上明确了高含量利它素的分泌与性附腺分泌细胞中丰富的粗面内质网、高尔基体和线粒体有着密切的关系。本研究进一步从分泌细胞中核酸和蛋白质的分子水平研究家蚕雌蛾性附腺发育的不同时期核酸和利它素变化的相互关系，以期确定利它素分子生物学研究时要分离纯化RNA的组织部位和最佳的解剖相关组织的时期，为开展利它素相关基因的文库构建及克隆打好基础。

1 材料与方法

室内用桑叶饲养家蚕（品种为丰交54A）至化蛹。自化蛹后第6天（复眼从淡黄开始转红）开始，每天定时取样，直至成虫羽化后第4天止。每次均在冰台上解剖得性附腺（每头雌蛹或成虫的性附腺含1对贮存部和1对分泌部），在其贮存部和分泌部的交界处用刀切开，然后按TRIZOL试剂盒（GIBCOBRL）提供的方法，分别进行整个附腺、贮存部和分泌部的总RNA、DNA及总蛋白质提取，mRNA分离采用磁珠分离法（Promega公司）。再将所得的总蛋白按高其康等（2000）的方法在Diol 150型分子筛柱中进一步进行高效液相色谱（HPLC）分离，并以保留时间最短的第一主峰（利它素的活性峰）的相对含量作为利它素在总蛋白中的相对含量。总RNA、DNA定量用分光光度法测定。总蛋白质含量按Lowry等（1951）的方法测定。

2 结果与分析

2.1 性附腺内总蛋白含量及利它素含量的变化

不同时期性附腺中蛋白质含量和利它素相对含量的测定结果（图1）表明，化蛹第6天（P6）到羽化当天（A0）总蛋白质含量从（170±50）μg/对增加到（860±70）μg/对，且呈直线上升，随后的3天仍维持在较高水平，羽化后第4天随雌蛾排卵量的增加而迅速下降。用HPLC对各时期总蛋白中的利它素进行分离，结果表明，第一主组分（具利它素活性）的峰面积占总蛋白峰面积的百分比随附腺的发育期不同而发生变化，从化蛹第6天的占总蛋白质的10%提高到羽化当天的58%，随后一直维持在这一水平。

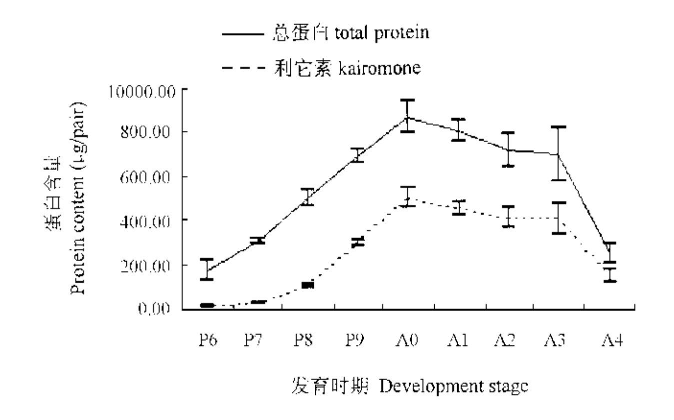


图1 不同发育时期家蚕雌蛾性附腺中总蛋白和利它素含量的变化

Fig. 1 The changes of total protein and kairomone content in the *B. mori* female accessory gland at different development stages

P6～P9：化蛹后第6至第9天；A0：羽化当天；A1～A4：羽化后第1至第4天；下同

P6–P9: 6th to 9th days after pupation; A0: the day of eclosion; A1–A4: first to 4th day after eclosion; The same for the following tables

2.2 性附腺内总RNA含量的变化

性附腺总RNA含量的变动情况（图2）显示，总RNA含量从化蛹第6天到第9天大体上与蛋白质变化趋势一样呈直线上升，但上升的速度比蛋白质的快。总RNA含量在化蛹第9天时为最高，达（105.41±7.94）μg/对，比性附腺内蛋白质含量最高时要提前一天。羽化当天总RNA仍维持在较高水平（104.97±9.38μg/对），羽化后第1天至第4天则下降很快。

2.3 性附腺不同部位中RNA含量及DNA含量的比较

性附腺中司不同功能的分泌部和贮存部中总RNA和DNA含量的逐天测定结果显示，分泌部总

RNA 含量的变化与整个性附腺总 RNA 的变化完全一致，它们之间的相关系数高达 0.99（$P < 0.01$）。化蛹第 9 天分泌部的总 RNA 含量（103.57 ± 6.34 μg/对），占整个性附腺（105.41 ± 7.94 μg/对）的 90% 以上。贮存部总 RNA 含量变化很小，且总 RNA 含量远少于分泌部，化蛹第 9 天约是分泌部总 RNA 含量的十分之一（图 3）。分泌部和贮存部提取的总 RNA 不仅在含量上差异很大，而且从琼脂糖凝胶电泳中发现在 28S 和 18S 处的相对含量也存在很大差异，分泌部总 RNA 中 28S 亚基的含量远低于 18S 亚基的，而贮存部总 RNA 则符合常规细胞中提取总 RNA 的电泳行为，在 EB 的染色强度上 28S 约为 18S 的 2 倍（图 4）。这一差异，在进一步分离到的 mRNA 中得以充分的体现，从化蛹第 9 天分泌部中提取的总 RNA 中分离的 mRNA 在电泳中呈条带分布，可明显见有 5 个峰，其中 4.8 kb 的带含量最高（图 5：1）。而贮存部的则没有明显带，是呈约 1.0 kb 为最高含量分别向以长片段和短片段含量不断减少方向分布（图 5：2）。

尽管随着蛹发育的不断成熟并最终羽化为成虫，家蚕雌蛾性附腺分泌部总 RNA 变化很大，但相应的 DNA 变化则比较平缓，DNA 含量从化蛹第 6 天到第 7 天有所上升，第 7 天到羽化后第 2 天之间变化很少。与分泌部相比，除了贮存部 DNA 含量比分泌部低外，变化则更小（图 6）。

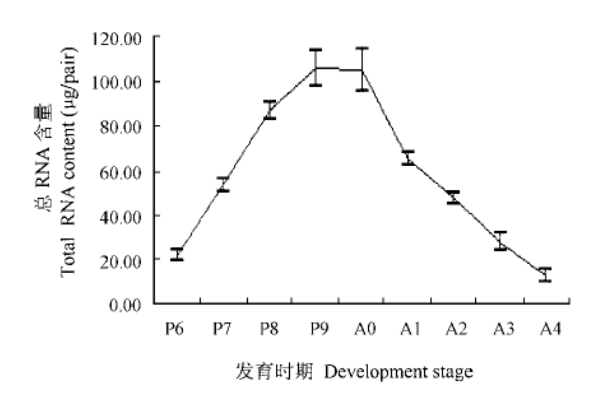


图 2　不同发育时期家蚕雌蛾性附腺中总 RNA 含量的变化

Fig. 2　The changes of total RNA content in *B. mori* female accessory gland at different development stages

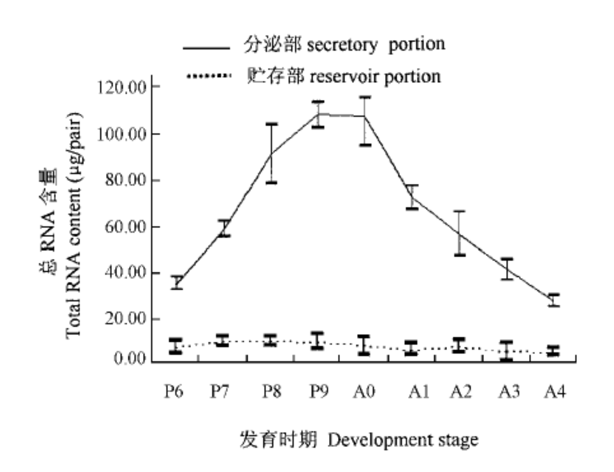


图 3　不同发育时期家蚕雌蛾性附腺分泌部和贮存部中总 RNA 含量的变化

Fig. 3　The changes of total RNA content in secretory portion and reservoir portion of *B. mori* female accessory gland at different development stages

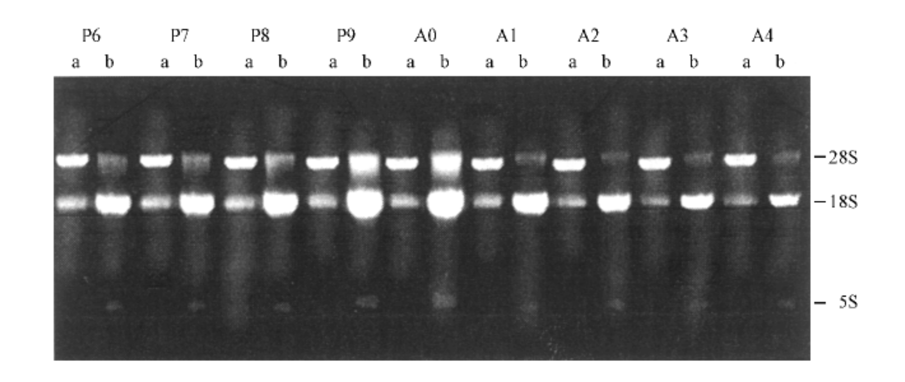


图 4　不同时期家蚕雌蛾性附腺贮存部（a）和分泌部（b）中总 RNA 的电泳图

Fig. 4　The electrophoretogram of total RNA in reservoir portion (a) and secretory portion (b) of *B. mori* female accessory gland at different development stages

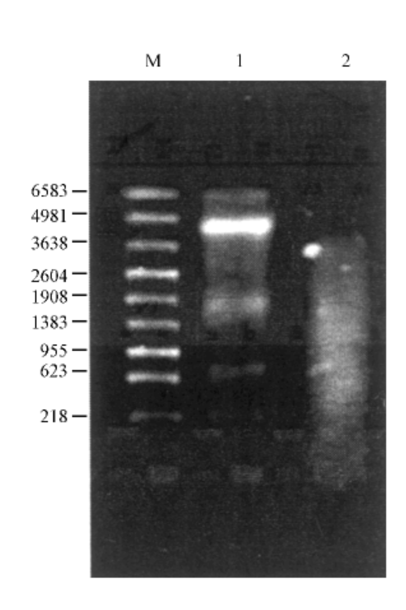


图5 家蚕雌蛾性附腺分泌部和贮存部中mRNA的电泳图

Fig. 5 Electrophoretogram of mRNA fractions in the secretory and reservoir portions of the *B. mori* female accessory gland

M：RNA标准分子量；1：分泌部中的mRNA；2：贮存部中的mRNA. M：RNA marker（Promega）；1：mRNA in secretory portion；2：mRNA in reservoir portion

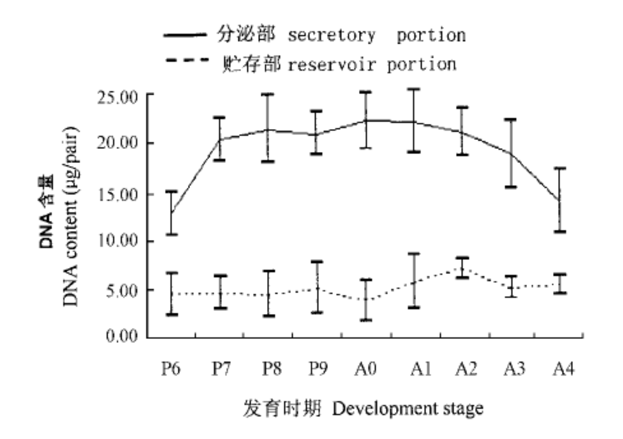


图6 不同时期家蚕雌蛾性附腺分泌部和贮存部中DNA含量的变化

Fig. 6 Changes in DNA content in the secretory and reservoir portions of the *B. mori* female accessory gland at different development stages

3 讨论

对家蚕性附腺的早期研究大都局限在家蚕卵的粘附性方面，也对附腺内分泌物的性质作了探讨。如Kasai和Hirasawa（1933）就证实附腺蛋白中不存在糖蛋白。Nakamura和Inokuchi（1977）认为这种家蚕卵的胶着物质至少由17种多肽组成。到20世纪90年代初，我们对野蚕黑卵蜂的寄生行为及其理化基础的研究证实家蚕雌蛾性附腺分泌物除了对家蚕卵在产卵场所有粘附作用外，还有一个更重要功能，即分泌物中存在一种能引诱家蚕的近缘种野蚕 *T. mandarina* 的卵寄生蜂——野蚕黑卵蜂 *Telenomus theophilae* 搜索并在卵上产卵的功能。为了对这种信息化合物——野蚕黑卵蜂寄主识别利它素进行系统的分子生物学研究，明确与利它素分泌相关的家蚕雌蛾性附腺的发育及附腺各功能细胞区中核酸和蛋白质的变化规律，是克隆该利它素的相关基因基础。

家蚕雌蛾性附腺在整个发育过程中，附腺的外部形态结构形成明显的两部分，一是近中输卵管侧的成对圆柱形囊状贮存部；二是与贮存部相连的呈树枝状分枝的分泌部。已有报道证实这两部分不仅在形态上存在很大区别，而且在功能上也不同，贮存部的功能是贮存由分泌部合成的粘着物，而分泌部则是粘着物分泌的场所（Kasai and Hirasawa，1933；Tsujita，1948；Nakamura and Inokuchi，1977）。本文作者对家蚕蛹期和成虫期不同发育时期、不同部位组织中的核酸、蛋白质及利它素含量的变化进行了较为详细的研究，结果表明家蚕雌蛾性附腺的分泌部细胞中的核酸、蛋白质和利它素含量在不同时期变化非常明显。表现之一是在分泌部细胞的蛋白质合成有很高的效率，从化蛹第6天到羽化当天，蛋白质从170 μg到860 μg；表现之二是与蛋白质合成密切相关的总RNA的变化也非常特殊，而且这些特殊的变化主要表现在分泌部组织上，贮存部组织变化很小且含量低；表现之三是家蚕分泌部中的RNA变化趋势及积累速度与蛋白质的变化基本一致，只是这两者所达到最高含量在时间上RNA比蛋白质提前了一天，这在一定程度上说明了家蚕性附腺能在短时间内分泌大量蛋白的原因；表现之四是在所分泌产生的蛋白质中的利它素含量非常高，最高时可占总蛋白58%，这对于该利它素应用有着非常重要的意义；表现之五是从高峰时的分泌部总RNA中分离得到的mRNA组成与贮存部中的相比也有明显差异，前者出现5条明显的条带，且在4.8 kb处的mRNA带占绝对优势。我们从上述的这些特性并结合相关分子生物学的知识可知特定时期家蚕雌蛾性附腺分泌部细胞中高丰度蛋白质的合成，与这一时期早些时候分泌细胞中转录的高丰度mRNA有着密切关系。这一结论为我们进

一步克隆利它素蛋白的相关基因提供了选择材料的最佳时机，化蛹第9天至羽化当天的家蚕雌蛾性附腺分泌部是分离克隆利它素相关基因的最佳材料。

参 考 文 献 （References）

Callanan P S，Cassio B J，1963. Histology of the reproductive tracts and transmission of sperm in the corn earwoorm，*Heliothis zea*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*，56：535–556.

Ferro D N，Akre R D，1975. Reproductive monphology and mechanies of mating of the coeing moth *Laspeyrewia pomenolla*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*，68：417–424.

Gao Q K，Hu C，1995. Source and characterization of an egg recognition kairomone of *Telenomus theophilae* Wu *et* Chen. *Journal of Zhejiang Agricultural University*，21（4）：583–587.［高其康，胡萃，1995. 野蚕黑卵蜂寄主识别利它素的来源和性质. 浙江农业大学学报，21（4）：583–587］

Gao Q K，Hu C，2000a. Influence of temperatures on the activity of host recognition kairomone of *Telenomus theophilae*. *Acta Entomologica Sinica*，43（4）：373–379.［高其康，胡萃，2000a. 温度对野蚕黑卵蜂寄主利它素的影响. 昆虫学报，43（4）：373–379］

Gao Q K，Hu C，2000b. Study on ultrastructure of female accessory gland of *Bombyx mori* concerted with secreting kairomone of *Telenomus theophilae*. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*，19（3）：385–392.［高其康，胡萃，2000b. 与利它素分泌相关的家蚕雌蛾性附腺的超微结构研究. 电子显微学报，19（3）：385–392］

Kasai T，Hirasawa T，1933. Studies on the glutious substance from mucous gland of female moth in the silkworm，*Bombyx mori*. *Journal of Sericulture*，15（9）：595–615.

Lowry O H，Rosebrough N J，Farr A L，Randall R J，1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*，109：265–275.

Nakamura K，Inokuchi T，1977. Amino acid composition and synthesis of glutious substance in the silkworm，*Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*，46（2）：120–124.

Nordland D A，Strand M R，Lewis W J，Vinson S B，1987. Role of kairomones from host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and *Trichogramm apretiosum* with partial characterization. *Entomol. Exp. Appl.*，44：37–43.

Strand M R，Vinson S B，1983a. Host acceptance behavior of *Teleomus heliothidis*（Hymenoptera：Scelionidae）toward *Heliothis virescens*（Lepidoptera：Noctuidae）. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*，76（40）：781–785.

Strand M R，Vinson S B，1982. Source and characterization of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis*，a parasitoid of *Heliothis virescens*. *Physiol. Entomol.*，7：83–90.

Strand M R，Vinson S B，1983b. Analyses of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis*（Hymenoptera：Scelionidae），isolation and host function. *J. Chem. Ecol.*，9（3）：423–432.

Tsujita M，1948. A cytological study on the mucous glands in the female silkworm-moth，with special reference to the roles played by the nucleus，the mitochondria and the golgi bodies in secretion. *Bull. Sericul. Exp. Sta.*，12（6）：633–648.